

# ĐA DẠNG PHÂN TỬ VÀ MỐI LIÊN QUAN VỚI TÍNH KHÁNG THUỐC CỦA CHỦNG LAO *M. tuberculosis* PHÂN LẬP Ở HƯNG YÊN

Nguyễn Duy Hưng<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Vân Anh<sup>2</sup>, Phạm Kim Liên<sup>2</sup>,  
Trần Thanh Hoa<sup>2</sup>, Hồ Minh Lý<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sở Y tế Hưng Yên; <sup>2</sup>Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Nghiên cứu tính đa dạng phân tử và mối liên quan với tính kháng thuốc của vi khuẩn lao góp phần kiểm soát bệnh lao. **Mục tiêu:** Phân tích tính đa dạng phân tử và mối liên quan với tính kháng thuốc chủng vi khuẩn lao Hưng Yên. **Phương pháp nghiên cứu:** Phân tích sinh học phân tử; phân tích thông kê sinh học. **Kết quả:** Dòng Bắc Kinh phổ biến nhất chiếm 37,3%, tiếp theo là dòng Đông Phi Ấn (EAI) chiếm 22,4%, dòng Haarlem, dòng MANU và dòng T chỉ có ở một vài chủng. 94,7% chủng Bắc Kinh có kiểu MIRU type khác nhau. Tỷ lệ đơn kháng và đa kháng thuốc của chủng lao Hưng Yên tương ứng là 40,3% và 10,4%, trong đó tỷ lệ kháng của dòng Bắc Kinh là 70% và 21,7%, các dòng khác tỷ lệ kháng thuốc còn thấp. **Kết luận:** Chủng lao Hưng Yên có tính đa dạng phân tử cao và mức độ kháng thuốc dao động khác nhau ở các dòng lao khác nhau.

Từ khóa: Bệnh lao, *M. tuberculosis*, spoligotype, MIRUs-VNTR, kháng thuốc

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với vi khuẩn lao *M. tuberculosis*, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng các phương pháp phân tích phân tử để xác định tỷ lệ các nhóm chủng ở các khu vực địa lý khác nhau nhằm phát hiện mức độ phổ biến của các genotype điển hình để từ đó nhìn nhận vai trò của chúng trong dịch tễ học bệnh lao đặc thù cho từng khu vực. Việc phân tích còn giúp cho các điều tra dịch tễ học truy tìm nguồn lây, phát hiện các vụ dịch từ đó đưa ra các biện pháp phòng và điều trị thích hợp. Dòng lao phổ biến nhất ở Việt Nam là dòng Bắc Kinh, chiếm từ 35-54% trong số các chủng lao phân lập từ bệnh nhân lao người lớn [1, 2] và thường gắn liền với bệnh lao kháng thuốc. Nghiên cứu tính đa dạng của chủng lao Bắc Kinh cũng góp phần không nhỏ trong việc kiểm soát nhóm chủng lưu hành này.

Trong nghiên cứu này chủng lao *M. tuberculosis* được phân lập trong một điều tra cắt ngang năm 2005 và điều tra lại năm 2007 trên địa bàn tỉnh Hưng Yên được phân tích với **mục tiêu:**

*Nghiên cứu tính đa dạng phân tử và mối liên quan với tính kháng thuốc của chủng *M. tuberculosis* phân lập ở Hưng Yên.*

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

67 chủng lao *M. tuberculosis* phân lập trên các đối tượng điều tra sống trong tỉnh Hưng Yên năm 2005 và 2007.

### 2. Phương pháp nghiên cứu:

*Phương pháp spoligotyping* là phương pháp định type phân tử dựa trên kỹ thuật PCR sử dụng cặp đoạn mỗi gắn biotin khuếch đại số lượng của các đoạn trung gian trong cụm lặp lại trực tiếp đa hình DR (Highly polymorphic Direct Repeat) trên genome của vi khuẩn lao. Các đoạn trung gian sau khi được nhân lên được lai với các oligonucleotid gắn trên màng lai tương ứng với 43 đoạn trung gian trong trình tự DR. Màng được rửa và ủ với cộng hợp và bộc lộ trên phim để phát hiện hình ảnh spoligotype.

Phương pháp MIRUs – VNTR là phương pháp xác định tần xuất lặp lại của các đơn vị lặp lại nằm rải rác (Mycobacterial Interspered Repetitive Units - MIRUs) trên nhiễm sắc thể vi khuẩn *M.tuberculosis*. 12 đoạn lặp được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sau đó được điện di trên gel Agarose cùng với ADN chuẩn bậc thang 100bp. Chiều dài mỗi đoạn lặp và số lần lặp lại của đơn vị lặp lại được xác định bằng cách so sánh với ADN chuẩn và băng chuẩn.

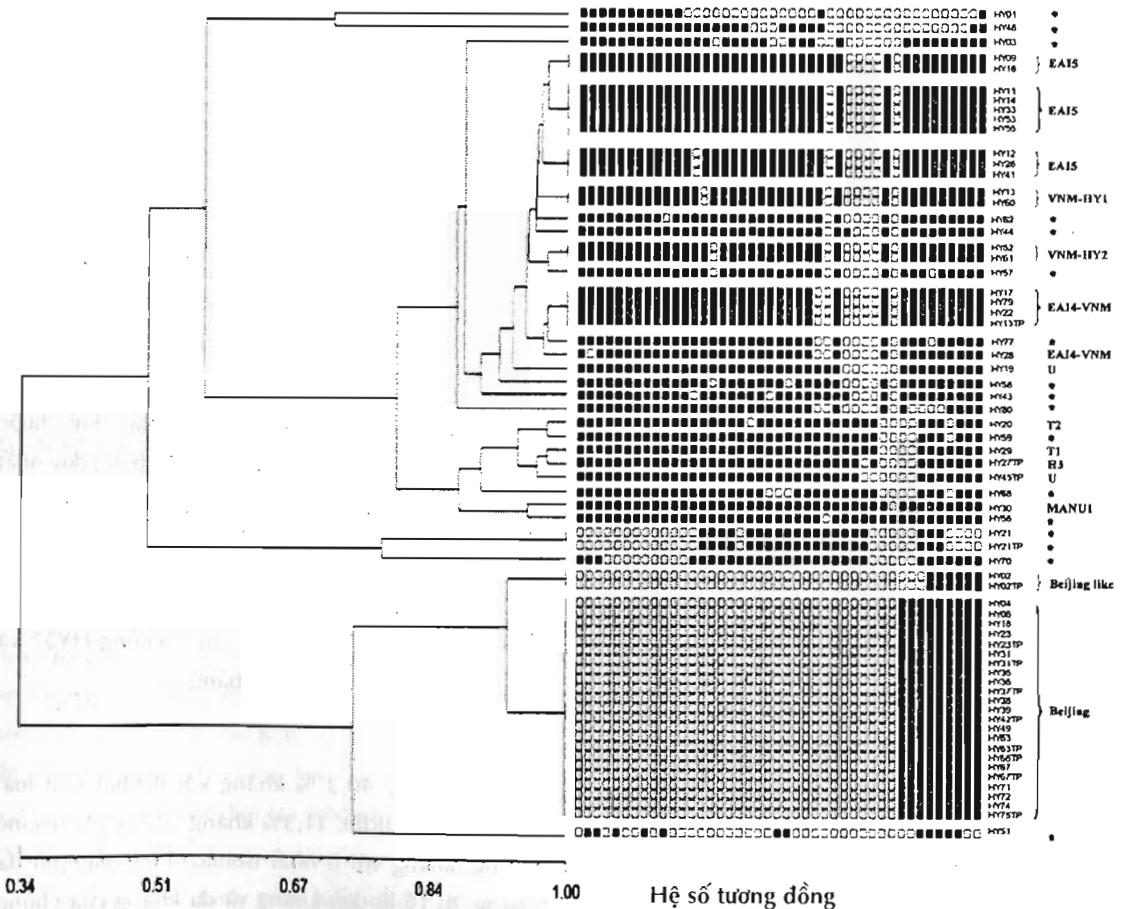
Đối chiếu kết quả spoligotyping với cơ sở dữ liệu spoligotyping quốc tế SpolDB4, sau đó phân tích bằng phần mềm phân tích thông kê sinh học

NTSYSpc 2.10 (Applied Biostatistics Inc.) để cho ra cây di truyền. Spoligotype, tính nhạy cảm với thuốc chống lao được phân tích bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 17.0 để tìm hiểu sự phân bố và tính nhạy cảm thuốc của các dòng lao điển hình.

### III. KẾT QUẢ

#### 1. Phân tích spoligotyping

Sáu mươi bảy chủng lao được phân nhóm thành 32 spoligotype. Trong đó 13 spoligotype đã được xác định gồm 46 chủng, chiếm 68,7% và 19 spoligotype chưa có trong spolDB4 (đánh dấu \*) gồm 21 chủng, chiếm 31,3% (hình 1).



giống chủng Bắc Kinh; EAI: Chủng Đông Phi Ấn; EAI-VNM: chủng Đông Phi Ấn- Việt Nam; H: chủng Haarlem; T: chủng T; MANU: chủng MANU; U: chủng chưa xác định dòng (lineage) trong SpolDB4 .

**Bảng 1. Phân bố của chủng lao Hưng Yên theo các dòng lao điển hình**

Dòng vi khuẩn lao	Spoligotype (ST)	Số chủng (%)	Tổng số chủng (%)
Beijing	1	23 (34,3)	25 (37,3)
Like Beijing	250	2 (3,0)	
EA14-VNM	139, 1731,	5 (7,5)	15 (22,4)
EAI5	152, 236, 617	10 (14,9)	
H3	50	1 (1,5)	1 (1,5)
MANU1	100	1 (1,5)	1 (1,5)
T1	53	1 (1,5)	1 (1,5)
T2	1077	1 (1,5)	1 (1,5)
U	458, 124	2 (3,0)	2 (3,0)
Chưa có trong SpolDB4		17 (25,4)	
VNM-HY1		2 (3,0)	21 (31,3)
VNM-HY2		2 (3,0)	
<b>Tổng số</b>		<b>67 (100,0)</b>	<b>67 (100,0)</b>

Các spoligotype đã biết thuộc về 5 dòng lao điển hình là dòng Bắc Kinh (Beijing), gồm 23 chủng Bắc Kinh và 2 chủng giống Bắc Kinh (Beijing like), chiếm 37,3%, dòng Đông Phi Ấn (EAI) gồm 15 chủng chiếm 22,4%, trong đó 5 chủng EA14-VNM và 10 chủng EAI5, dòng Haarlem (H) có 1 chủng H3, dòng MANU có 1 chủng MANU1, dòng T gồm 1 chủng T1 và 1 chủng T2, và 2 chủng U chưa xác định thuộc dòng nào trong SpolDB4. Hầu hết các spoligotype chưa có trong SpolDB4 chỉ thấy ở một chủng duy nhất trừ 2 spoligotype, mỗi spoligotype được tìm thấy ở 2 chủng khác nhau do vậy được đặt tên là VNM-HY1 và VNM-HY2 (bảng 1 và hình 1).

## 2. Kết quả phân tích MIRUs – VNTR

Phân tích 19 chủng lao Bắc Kinh bằng phương pháp MIRUs-VNTR cho thấy trừ 2 chủng HY57 và HY06 có cùng MIRU type, tất cả các chủng còn lại đều có MIRU type khác nhau (bảng 2).

## 3. Tính nhạy cảm thuốc của chủng lao Hưng Yên

Phân tích tính kháng thuốc của chủng lao Hưng Yên cho thấy 40,3 % kháng với ít nhất một loại thuốc, 28,4% kháng với isoniazid (INH), 12,5% kháng với rifampin (RIF), 31,3% kháng với streptomycine (SM), 17,9% kháng với ethambutol (EMB). Tỷ lệ đa kháng (kháng với ít nhất isoniazid và rifampin) là 10,4%. Số chủng nhạy cảm hoàn toàn chiếm 59,7% (bảng 3). Tỷ lệ đơn kháng và đa kháng của chủng Bắc Kinh lên tới 70% và 21,7% (Bảng 3). Mức độ kháng thuốc của chủng có spoligotype chưa có trong SpolDB4 gần tương đương với mức độ kháng thuốc chung. Mức độ kháng thuốc của dòng Đông Phi Ấn còn thấp, 80% số chủng EA14-VNM và 100% số chủng EAI5 nhạy cảm thuốc (bảng 3).

Bảng 2. Kiểu MIRU type của một số chủng lao dòng Bắc Kinh tỉnh Hưng Yên

Mã chủng	MIRU type											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
HY23	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
HY46	2	2	2	3	1	5	1	9	2	5	2	3
HY38	2	2	3	3	2	5	1	1	2	4	2	3
HY71	2	2	3	3	2	5	1	6	3	4	3	2
HY30	2	2	3	3	2	5	1	6	3	5	3	3
HY67	2	2	3	3	2	5	1	6	3	5	4	3
HY04	2	2	3	3	2	5	1	6	4	5	3	4
HY72	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
HY06	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3

Bảng 3. Tính nhạy cảm thuốc của chủng lao Hưng Yên

Dòng lao	Số kháng thuốc		Nhạy cảm thuốc			
	INH (%)	RIF (%)	SM (%)	EMB (%)	INH+RIF (%)	
Beijing	12 (52,2)	5 (21,7)	12 (57,1)	9 (39,1)	5 (21,7)	7 (30,0)
Dòng khác	3 (13,0)	1(4,3)	2(8,7)	1(4,3)	1(4,3)	20 (87,0)
Chưa xác định	4 (23,5)	2 (9,5)	7 (33,3)	2 (9,5)	1(4,8)	10 (58,8)
<b>Toàn bộ</b>	<b>19 (28,4)</b>	<b>8 (12,5)</b>	<b>21 (31,3)</b>	<b>12 (17,9)</b>	<b>7 (10,4)</b>	<b>40 (59,7)</b>

#### IV. BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên về đa dạng phân tử chủng lao phân lập từ bệnh nhân lao tỉnh Hưng Yên trong một điều tra cắt ngang trên toàn tỉnh với thiết kế quy mô, mang tính đại diện cao. Kết quả cho thấy mức độ phổ biến của các dòng lao tại Hưng Yên tương tự các quốc gia khác trong khu vực [1, 4, 5] và phù hợp với nghiên cứu trước đó của Nguyễn Thị Vân Anh và cộng sự khi nghiên cứu vi khuẩn lao tại một số khu vực tỉnh Hà Tây và Hà Nội [1].

Dòng lao Bắc Kinh phổ biến nhất tại Hưng Yên, chiếm 37,3%. Đây cũng là dòng phổ biến nhất ở khu vực Đông Nam Á, chiếm từ 30 - 50% [1, 2, 4, 5]. Dòng EAI phổ biến thứ hai tại Hưng

Yên, chiếm 22,4%. Dòng EAI nguồn gốc từ Đông Phi Ấn chia làm 8 nhóm dưới dòng (sub lineage). EAI4 lưu hành phổ biến ở Việt Nam, được đặt tên là EAI4 - VNM [1, 4], tuy nhiên trong nghiên cứu chỉ chiếm 7,5%, trong khi EAI5 chiếm tới 14,9%. Tỷ lệ chủng EAI4 - VNN ở Hưng Yên thấp hơn nhiều so với tỷ lệ 21,4% ở Hà Tây và Hà Nội [1]. Dòng Haarlem, dòng T và dòng MANU chỉ có ở một vài chủng, phù hợp với mô hình phân bố địa lý của các dòng lao này trong SpolDB4 [4]. Nghiên cứu phát hiện 19 spoligotype mới chưa có trong SpolDB4, trong đó 2 cụm được đặt tên là VNM - HY1 và VNM - HY2 có kiểu spoligotype rất giống EAI5 (hình 1). Phân tích MIRUs - VNTR 19 chủng lao Bắc kinh cho thấy 94,7% số chủng Bắc Kinh có kiểu genotype khác nhau.

Kháng đơn thuốc và kháng đa thuốc (kháng với ít nhất rifampin và isoniazid) của chủng lao Bắc Kinh cao gấp đôi so với tỷ lệ kháng của cả nhóm chủng với tỷ lệ tương ứng là 70% và 21,7%. Tỷ lệ này của cả nhóm chủng lao Hưng Yên là 40,3% và 10,4%. Ngược lại, ở dòng Đông Phi Ấn tỷ lệ này lại rất thấp với 6,6% kháng đơn, 93,3% nhạy cảm hoàn toàn và không có chủng nào đa kháng thuốc. Tỷ lệ kháng thuốc ở nhóm có spoligotype chưa xác định gần tương đương với tỷ lệ chung, thấp hơn so với dòng lao Bắc Kinh nhưng lại cao hơn nhiều so với các dòng lao khác (41,2% và 5.9%), từ đó cho thấy tầm quan trọng về mặt dịch tễ của các chủng này trong khu vực tỉnh Hưng Yên.

## V. KẾT LUẬN

Chủng lao Hưng Yên có tính đa dạng phân tử cao. Chủng Bắc Kinh chiếm 37,3%, chủng Đông Phi Ấn chiếm 22,4%, chủng Haarlem, MANU và T chiếm 1,5 - 3%. 31,3% số chủng có spoligotype chưa có trong SpolDB4. 94,7% số chủng Bắc Kinh có kiểu genotype khác nhau. Tỷ lệ kháng thuốc chủng Bắc Kinh cao gấp đôi tỷ lệ chung. Các chủng lao có kiểu spoligotype chưa có trong SpolDB4 có mức độ kháng thuốc trung bình, các dòng lao khác mức độ kháng thuốc vẫn còn thấp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Vân Anh, Phạm Kim Liên, Trần Thị Thanh Hoa, Hồ Minh Lý, Trần Văn Sáng, Đặng Đức Anh. (2008). "Xác định kiểu nhóm phân tử chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao một số khu vực tỉnh Hà tây và Hà nội bằng phương pháp spoligotyping," *Tạp chí Y học Dự phòng*, XVIII(7(99)): 27 - 34.
2. Anh, D.D., M.W. Borgdorff, L.N. Van, N.T. Lan, T. van Gorkom, et al. (2000). "Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam," *Emerg Infect Dis*, 6(3): 302 - 5.
3. Bifani, P.J., B. Mathema, N.E. Kurepina, B.N. Kreiswirth (2002). "Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W - Beijing family strains," *Trends Microbiol*, 10(1): 45 - 52.
4. Brudey, K., J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinger, A. Gori, et al. (2006). "Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology," *BMC Microbiol*, 6: 23.
5. Phyu, S., R. Stavrum, T. Lwin, O.S. Svendsen, T. Ti, et al. (2009). "Predominance of Mycobacterium tuberculosis EAI and Beijing lineages in Yangon, Myanmar," *J Clin Microbiol*, 47 (2): 335 - 44.

### Summary

#### MOLECULAR DIVERSITY OF *M. tuberculosis* STRAINS ISOLATED IN HUNG YEN PROVINCE, VIET NAM

The study of molecular diversity and its relation to drug resistance of *M. tuberculosis* can contribute to the control of tuberculosis. **Objectives:** Analyze the molecular diversity and its relation to drug resistance of *M. tuberculosis* strains isolated in Hung yen province. **Methods:** Molecular biology methods; biostatistics analysis. **Results:** The Beijing lineage was most prevalent, account for 37.3%, the second most prevalent lineage was the East African Indian, account for 22.4%. The Haarlem, the MANU, the T lineages were only presented in several strains. 94.7% of the Beijing strains had different MIRU types. The percentage of single drug and multidrug resistance of the Hung yen *M. tuberculosis* strains was 40.3% and 10.4%, respectively. These rates were 70% and 21.7% for Beijing lineage, but still very low for other lineages. **Conclusion:** The *M. tuberculosis* strains in Hung Yen had high molecular diversity and the level of drug resistance was varied between different lineages.

**Keywords:** Tuberculosis, spoligotyping, MIRUs - VNTR, drug resistance